

環境試料中のハロゲン化合物の検出技術の開発

第二技術室化学計測技術班 瀬戸 六左衛門

1. はじめに

環境試料中のトリハトメタン類やダイオキシン、内分泌攪乱物質（環境ホルモン）等は、環境汚染物質として指定されており、その検出法について様々な研究がなされている。これらの環境汚染物質は、ハロゲンと結びついていて、毒性もしくは猛毒性を発揮し、分解も困難である。

塩素系プラスチック廃棄物や、塩素系廃溶剤などの焼却処理に際し、熱的変換反応による新たな有害塩素化合物の生成が懸念されており、クロロベンゼン類、クロロスチレン類、低級塩素化合物などの発生も報告されている。クロロフェノール類もこうした熱的変換反応生成物の一つであり、燃焼条件によっては、クロロベンゼン類から更に有害なポリ塩化ジベンゾジオキシン（PCDD）が生成される際の間中生成物と考えられており、日常的には、ゴミ焼却に伴って排出されるダイオキシンが問題となっている。

PCDD生成の間中生成物と考えられているo-, m-, p-クロロフェノールのラットの対するLD₅₀はそれぞれ0.67、0.57、0.67g/kgと報告され、毒性としては強いほうではないが、高濃度のフェノール類を短期あるいは長期に暴露すると様々な生理的影響が現れ、病理的所見も報告されている。

このような背景から、環境水及び排水に含まれるフェノール類、そのハロゲン化合物としてのクロロフェノールの検出を試みた。

フェノール類の定量法としてはJIS K 0102 に4-アミノアンチピリン吸光光度法（4-AA法）が定められているが、前処理の操作が煩雑であり、検出感度も不十分である。そこで、4-AA法の高感度化を目的に固相抽出を用いて濃縮・分離し、その検出法を検討したところ、簡便に20～100倍程度の濃縮が可能であることが分かった。

2. 実験

2・1 試薬

クロロフェノール標準溶液：和光純薬製、試薬特級クロロフェノールを蒸留水に溶かして 10^{-2} M溶液を調整し、適宜希釈して用いた。

フェノール標準溶液：和光純薬製、試薬特級フェノールを蒸留水にとかして $100\mu\text{g ml}^{-1}$ 溶液を調整し、適宜希釈して用いた。

O-クレゾール、m-クレゾール標準溶液：いずれも和光純薬製、試薬特級を用い、フェノール標準溶液と同様に調整した。

1% 4-アミノアンチピリン溶液：和光純薬製、試薬特級4-アミノアンチピリン（4-AAと略記）1.0gを蒸留水に溶かして100mlとした。

1%ヘキサシアノ鉄（Ⅲ）酸カリウム：和光純薬製、試薬特級ヘキサシアノ鉄（Ⅲ）

酸カリウム 1.0 g を蒸留水 100 ml に溶かして調整した。

緩衝液：塩化アンモニウムとアンモニア水を用いて $\text{pH}=10$ 溶液を調整した。 $\text{pH}=4$ の緩衝液はリン酸二水素カリウムと希リン酸を用いて調整した。

60%アセトニトリル、90%メタノールは和光純薬製、残農用試薬を、蒸留水で希釈して用いた。

その他の試薬は、市販特級品を用いた。

2・2 装置

吸収スペクトル及び吸光度の測定は、日立200-20形吸光光度計を使用した。セルは光路長10mmのガラスセルを用いた。 pH の測定には、東亜電波製 HM-5S 形 pH メーターを使用した。

2・3 標準操作

10^{-5} M クロロフェノール標準溶液、または、 $10\mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール標準溶液1~10ml を25ml メスフラスコに採り、塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液 ($\text{pH}10$) 1ml、1% 4-AA 1ml、1% ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム5ml を加え、蒸留水で標線に合わせる。同様に操作した試薬空試験液を対照にしてクロロフェノールは509 nm、フェノール類は502 nm で吸光度を測定する。

2・4 濃縮操作

2・4・1 Sep-Pak C18 による濃縮法

Sep-Pak C18 (Waters 製) は前処理としてメタノール2ml を通し、蒸留水5ml で洗い流す。この操作を2回繰り返したものをを用いた。2・3の標準操作を行い、クロロフェノールまたはフェノール類の発色溶液を作る。この発色溶液をSep-Pak C18 に通して吸着させた後、60%アセトニトリル4ml で溶離し、クロロフェノールは509nm で、フェノール類は502 nm で吸光度を測定する。

2・4・2 Porapak RDX による濃縮法

Porapak RDX (Waters 製) は前処理として、メタノール10ml を通し、蒸留水10ml で洗浄したものをを用いた。クロロフェノールまたはフェノール類標準溶液を25ml メスフラスコに採り、リン酸緩衝液 ($\text{pH}4$) 3ml を加え、蒸留水で25ml とする。この溶液をPorapak RDX に通す。90%メタノール水溶液5ml で溶離し、2・3の標準操作により発色させ、試薬空試験液を対照にして、509 nm、502 nm で吸光度を測定する。

3 結果と考察

3・1 吸収スペクトル

10^{-5} M クロロフェノール5ml、フェノール類は $10\mu\text{g ml}^{-1}$ 標準溶液7ml を25ml メスフラスコに採り、2・3、2・4・1、及び2・4・2の操作に従ってそれぞれの吸収スペクトルを測定した。その結果、クロロフェノールは509 nm、フェノール類は502 nm で吸収極大が観測された。

3. 2 4-AA 濃度の影響

2・3に従って、 $10\mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール標準溶液 7ml に対する 4-AA の添加量の影響を検討した。1%4-AA 濃度を变化させたところ、1~1.5 ml の範囲で一定の吸光度が得られた。1.5 ml 以上添加すると空試験液の吸光度が増大したので、本実験では 1%4-AA の添加量を 1 ml とした。

3. 3 ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム濃度の影響

2・3に従って、 $10\mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール標準溶液 7ml に対するヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウムの添加量の影響を検討した。その結果、1%ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム 4~6 ml の範囲で一定の吸光度が得られた。6 ml 以上では空試験液の吸光度は増大し、4 ml 以下では吸光度が低くなるため、本実験では 1%ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム添加量を 5 ml とした。

3. 4 溶離液濃度及び溶離液量の影響

3. 4. 1 Sep-Pak C18

$10\mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール標準溶液 1 ml を用い、2・4・1の操作に従って、Sep-Pak C18 に吸着させ、その溶離について検討した。

溶離液量を 4 ml に固定し、溶離液であるアセトニトリルの濃度を 40~100% の範囲で变化させたところ、60% 以下ではやや吸光度が低くなったが、60% 以上ではほぼ一定の吸光度が得られた。本実験では、60% アセトニトリルを用いてアミノアンチピリン色素を溶離することとした。

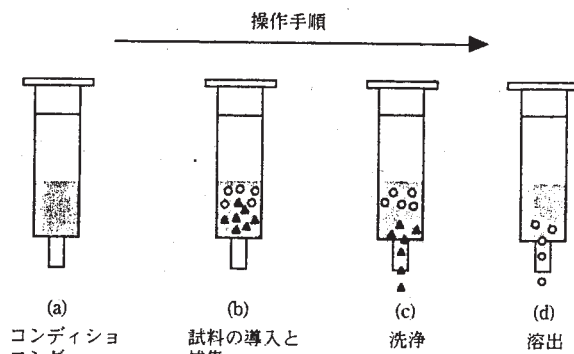


図1 固相抽出の基本操作

3. 4. 2 Porapak RDX

$10\mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール標準溶液 3 ml を用い、2・4・2の操作に従って、Porapak RDX に吸着させ、その溶離について検討した。溶離液量を 5 ml に固定し、溶離液であるメタノールの濃度を 60~100% の範囲で变化させたところ、濃度が増加するにつれ吸光度も増加したが、90% 以上ではほぼ一定の吸光度が得られた。この結果、90% メタノールを用いて溶離することとした。

3. 5 Sep-Pak C18による濃縮効果

10^{-4}M クロロフェノール標準溶液 0.25~2 ml、 $10\mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール類 0.5~2.5 ml を 25 ml メスフラスコに採り、2・3と2・4・1の操作に従って発色体を溶離し、最終容積を 5 ml とし、検量線を作成した。その結果、原点を通る良好な直線 ($r=0.998$) が得られた。

次に、クロロフェノールは最終濃度が $1\sim 6\times 10^{-6}\text{M}$ 、フェノール類は $0.1\sim 0.5\mu\text{g ml}^{-1}$ となるよう溶液を調整し、発色溶液の液量を 50、100、250 ml にし、上記と同様な操作を行い、検量線を作成した。その結果、濃度と吸光度の間にはいずれも $r=0.998$ の相関関係が得られ、検量線の傾きから濃縮効果が成立していることが分かった。

3. 6 Porapak RDX による濃縮効果

10^{-4} M クロロフェノール標準溶液 1 ~ 10 ml、フェノール類は $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ 標準溶液 1 ~ 10 ml を 25 ml メスフラスコに採り、2・3 及び 2・4・2 の操作に従い、検量線を作成した。その結果、原点を通る良好な直線 ($r=0.998$) が得られた。

また、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール標準溶液 2 ml 時の RSD ($n=5$) は 1.25% で測定体積を 10 ml とし、2.5 倍濃縮したときの RSD ($n=5$) は 0.98% であった。Porapak RDX を用いた場合も、検量線の傾きから濃縮効果が成立していることが分かった。

3. 7 水道水への添加回収率

本法を、環境試料に適用する目的で、水道水への添加回収実験を試みた。 10^{-4} M クロロフェノール標準溶液 0.5 ml、1 ml、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ フェノール類標準溶液 0.5 ml、1 ml を水道水 100 ml、500 ml に添加し、アミノアンチピリン色素を生成し Sep-Pak C18 で濃縮検出し、2・4・1 の操作に従って行ったものと比較した。この時の濃縮率は 20、100 倍で、クロロフェノールの回収率は 103、105%、フェノール類の回収率は 97、95% であった。

また、Porapak RDX を用いて、上記の操作で 10 倍、50 倍濃縮したときの回収率は、クロロフェノールの場合、98、96%、フェノール類は、94、91% であった。

Table 1 Concentrated effects by solid phase extraction

Elements	Enrichment factor	Recovery %	Elements	Enrichment factor	Recovery %
<u>Sep – Pak C18</u>			<u>Porapak RDX</u>		
C chloro phenol					
$10^{-4} \times 0.5$	20 (100→5)	103	$10^{-4} \times 0.5$	10 (100→10)	98
$\times 1$	100 (500→5)	105	$\times 1$	50 (500→10)	96
C phenol					
$10 \mu\text{g} \times 0.5$	20 (100→5)	98	$10 \mu\text{g} \times 0.5$	10 (100→10)	94
$\times 1$	100 (500→5)	96	$\times 1$	50 (500→10)	91

さらに、クロロフェノール標準溶液、フェノール標準溶液 0.25 ml を水道水 100 ml に添加し、Porapak RDX、次いで Sep-Pak C18 で濃縮し、それぞれの回収率を求めたところ、クロロフェノールの場合 97%、フェノールの場合 95% となった。この時の検出濃度は 5×10^{-6} M、 5 ng ml^{-1} である。

本研修では、環境試料中の汚染物質であるクロロフェノール及びフェノール類を固相抽出 (Sep-Pak C18 及び Porapak RDX) 法を用いて濃縮・検出を行った。その結果、Sep-Pak C18 を用いた場合は 20 ~ 100 倍濃縮が、Porapak RDX の場合は 10 ~ 50 倍の濃縮率が得られ、JIS 法より操作が簡便であり、定量下限も向上し、微量定量法として有用と思われる。

参考文献

- 1) 大関 邦夫. 糠塚 いそし: ぶんせき、86 (1998)
- 2) JIS K 0102 : 工場排水試験方法 (1993)